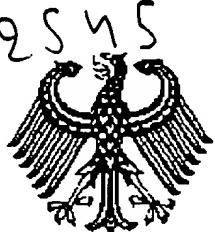


EP09/ 2845



REC'D 31 MAY 2000

WIPO

PCT

Bescheinigung

Das Institut für Pflanzenbiochemie IPB in Halle, Saale/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Linoleat- und Linolenat-Lipoxygenase-Mutanten"

am 30. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 N und A 01 H der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 16. Mai 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Jerofsky

Aktenzeichen: 199 14 464.8

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

LINOLEAT- und LINOLENAT-LIPOXYGENASE-MUTANTEN

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen von pflanzlichen Lipooxygenasen mit veränderter Positionsspezifität sowie die durch das Verfahren erhältene Lipooxygenase und deren Verwendung zur Hydroperoxylierung von Substraten.

Die LOXs (Linolensäure: Sauerstoff-Oxidoreduktase; EC.1.13.11.12; LOXs) sind im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet (Siedow, J.N. (1991) Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 145-188; Yamamoto, S. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1128, 117-131). Diese Enzyme stellen eine Familie aus eisenhaltigen Dioxygenasen dar, die eine Bereichs- (oder positions-) und stereoselektive Oxygenierung von Polyenfettsäuren zu Hydroperoxyderivaten katalysieren (Rosahl, S. (1996) Z. Naturforsch. 51c, 123-138). In Säugern werden LOXs nach ihrer Spezifität für bestimmte Positionen bei der Arachidonsäureoxygenierung klassifiziert (Yamamoto, S. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1128, 117-131; Schewe, T., Rapaport, S.M. & Kühn, H. (1986) Adv. Enzymol. Mol. Biol 58, 191-272). Da Arachidonsäure in höheren Pflanzen nicht vor kommt oder nur in geringen Mengen als Bestandteil von Speicherlipiden, werden LOXs aus Pflanzen als 9- und 13-LOXs klassifiziert. Diese Nomenklatur leitet sich von der Position ab, an der in Linolsäure (LA) die Oxygenierung erfolgt (Gardner, H.W. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1084, 221-239). In jüngster Zeit ist eine umfangreiche Klassifizierung pflanzlicher LOXs auf der Grundlage eines Vergleichs der Primärstrukturen vorgeschlagen worden (Shibata, D. & Axelrod, B. (1995) J. Lipid Mediators Cell Signal. 12, 213-228). Die Spezifität einer LOX für eine bestimmte Position ist das Ergebnis zweier katalytischer Teilreaktionen:

(i)

der Bereichs- und stereospezifischen Entfernung von Wasserstoff, wobei bei Fettsäuren, die mehrere Doppelbindungen enthalten (wie Linolensäure, Arachidonsäure oder Eikosapentaensäure), die Wasserstoffentfernung an verschiedenen Positionen erfolgen kann;

(ii)

der Bereichs- und sterospezifischen Sauerstoff-Insertion (wobei der Sauerstoff an verschiedenen Positionen (der +2 oder -2 Position) eingefügt werden kann (Vergleich Figur 1). Somit kann eine Fettsäure mit 3 doppelallylischen Methylenen, wie Arachidonsäure, von einer LOX zu 6 regioisomeren Hydroperoxyderivaten (HPETEs) oxydiert werden, nämlich zu 15- und 11-HPETE (diese stammen aus der Entfernung von Wasserstoff an Position C-13), 12- und 8-HPETE (diese stammen aus der Wasserstoffentfernung an Position C-10) und 9- und 5-HPETE (diese stammen aus der Wasserstoffentfernung an Position C-7). Experimente mit 12- und 15-LOX aus Säugern zeigten, daß die Position der Wasserstoffentfernung verändert werden kann, wenn kritische Aminosäuren durch gerichtete Mutagenese verändert werden

(Borngräber, S., Kuban, R. J., Anton, M. & Kühn, H. (1996) J. Mol. Biol. 264, 1145-1153; Sloane, D.L., Leung, R., Craik, C. S. & Sigal, E (1991) Nature 354, 149-152). Versuche zum Ändern der LOX-Reaktivität von einer +2 nach -2-Umlagerung oder umgekehrt (z. B. Umwandeln einer Linoleat-13-LOX zu einer 9-LOXs) mit Hilfe gerichteter Mutagenese waren bisher nicht erfolgreich.

Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, ein Verfahren anzugeben, mit dem LOXs gewünschter Positionsspezifität bereitgestellt werden können.

Dieses Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren, bei dem eine oder mehrere Aminosäuren in einer Wildtyp-LOX ausgetauscht werden.

Figur 1 zeigt die Spezifität einer LOX-Reaktion mit Substraten, die zwei allylische Methylenen enthalten.

Figur 2 zeigt die direkte und inverse Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum von LOXs.

Figur 3 zeigt ein Modell der Enzymsubstratwechselwirkung der Wildtyp-LOX aus Gurke und der Mutante H608V (entspricht H597V, wobei bei letzterer Nomenklatur die Numerierung gemäß der Sequenz aus Figur 5 angewendet wird).

Figur 4 zeigt die HPLC-Analyse von Hydroxyfettsäuren, die mit Hilfe der Wildtyp-LOX aus Gurke und der H597V-Mutante aus LA erhalten werden.

Figur 5 zeigt die Sequenz der Wildtyp-LOX aus *Cucumis sativus*.

Figur 6 zeigt die HPLC-Analyse von Hydroxyfettsäuren, die mit Hilfe der Mutante V531F aus γ -Linolensäure erhalten werden.

Figur 7 zeigt die HPLC-Analyse von oxidiertem Trilinolein, gebildet mit Wildtyp-Enzym und H597V Mutante.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Austausch der Aminosäuren im Bereich der Aminosäureposition 527 bis 536 bzw. 593 bis 602 der LOX aus *Cucumis sativus* oder einer korrespondierenden Position in einer LOX aus einer anderen Pflanzenart. Die oben angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf die Sequenz unter der Zugangsnummer X92890 in der NIH-Datenbank „Entrez“ bzw. der Sequenz gemäß Figur 5. Die zu den Aminosäurepositionen 527 bis 536 bzw. 593 bis 602 der Lipoxygenase aus *Cucumis sativus* korrespondierenden Positionen in LOXs aus anderen Pflanzenarten können durch Sequenzvergleiche zwischen der Sequenz X92890 und den weiteren Proteinsequenzen wie aus Sojabohnen, Kartoffel, Arabidopsis, Tabak oder Gerste leicht ermittelt werden. Die folgende Tabelle 1 zeigt das Ergebnis eines Aminosäurevergleichs zwischen dem aus Gurken stammenden Enzym und den korrespondierenden Positionen in den Enzymen aus anderen Pflanzen. Die erste Gruppe (13-LOX) zeigt einen Vergleich zwischen LOXs, die an Position 13 eine Hydroperoxy-Gruppe einführen, während die zweite Gruppe (9-LOX) einen Vergleich zwischen Sequenzen zeigt, die an Position 9 einen Hydroperoxy-Rest einführen.

Tabelle 1

Vergleich der Aminosäurereste, die vermutlich an der Spezifität einer pflanzlichen LOX für eine bestimmte Position (13 bzw. 9) beteiligt sind.

ENZYME Rest	Zugangs-Nr.	Position d. AS- Restes
13-LOX		
Gurke-Lipid-Körper LOX	X92890	596/597 Thr/His
LOX-1 aus Sojabohnensamen	P08170	556/557 Thr/Phe
LOX-H1 aus Kartoffeln	X96405	614/615 Ser/Phe
LOX-2 aus <i>Arabidopsis</i>	P38418	611/612 Cys/Phe
9-LOX		
LOX aus Kartoffel	P37831	579/580 Thr/Val
Elicitor-induzierte LOX aus <i>Tabak</i>	X84040	580/581 Thr/Val
LOX-A aus Gerstenkorn	L35931	574/575 Thr/Val

Das Sequenzmotiv bei Position 527 bis 536 lautet TVNDVGYHQL gemäß dem Einbuchstabencode für Aminosäuren in der hinterlegten Sequenz X92890. Das Sequenzmotiv bei Position 593 bis 602 lautet IETTHYPSKY (Sequenz gemäß X92890).

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Austausch an Position 531 und/oder 597 der Sequenz X92890. An Position 531 befindet sich im Wildtyp ein Val-Rest und an Position 597 ein His-Rest.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der Rest an Position 531 durch einen Phe- oder His-Rest und an Position 597 durch einen Val- oder Phe-Rest ersetzt.

Ganz besonders bevorzugt ist eine Ausführungsform bei der der Austausch an Position 531 einen Val- → Phe- und an Position 597 einen His- → Val-Austausch darstellt. Vorzugsweise wird jeweils nur einer der genannten Austausche in einem vorgegebenen Wildtyp durchgeführt. Dabei führt der Austausch in dem Bereich der Aminosäureposition 527 bis 536 dazu, daß die 13-LOX aus dem Lipidkörper von *Cucumis sativus* in eine γ -Linolensäure 6-LOX umgewandelt wird, während der Austausch an Position 597 zu einer Umwandlung der Linolsäure 13-LOX in eine Linolsäure 9-LOX führt. Im folgenden werden diese beiden Mutanten auch als V531F und H597V bezeichnet. Die Wildtypsequenz ist als Figur 5 gezeigt. Die Positionen 531 und 597 sind markiert.

Vorzugsweise erfolgt der Austausch der Aminosäuren in dem Wildtyp mit Hilfe der gerichteten Mutagenese, wie sie im Stand der Technik hinlänglich bekannt ist (vgl. z. B. Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M. & Kindl, H. (1998) FEBS Lett. 431, 433-436).

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin LOX-mutanten, die nach den oben beschriebenen Verfahren erhältlich sind. Bevorzugte Mutanten sind die V531F und H597V, wie oben näher erläutert. Die erfindungsgemäßen LOXs lassen sich mit Hilfe der aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren, wie der gerichteten Mutagenese, und der anschließenden Proteinexpression herstellen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen LOXs kodieren. Ausgehend von den im Stand der Technik verfügbaren Wildtypsequenzen, lassen sich die erfindungsgemäßen Sequenzen durch gerichtete Mutagenese herstellen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, in die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zum Zwecke der Klonierung und Expression eingebracht werden. Entsprechende Klonierungs- und Expressionsvektoren sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik hinlänglich bekannt (vgl. Maniatis et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine Zelle, in die die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder der erfindungsgemäße Vektor eingebracht werden. Nach Einbringen der Nukleinsäure bzw. des Vektors ist die Zelle dann in der Lage, eine LOX erstmalig oder in verstärktem Maße zu exprimieren. Auf diese Weise kann das Fettsäuremuster einer Zelle gezielt verändert werden mit dem Ergebnis, daß der Phänotyp der Zelle in verschiedener Hinsicht verändert werden kann. Hierzu zählt u. a. eine andere Zusammensetzung der Zellmembran.

Schließlich können durch *in vitro* -Kultivierungsverfahren aus den o. g. Zellen neue Pflanzen bzw. Pflanzenteile regeneriert werden. Zum Herstellen solcher transgener Pflanzen kann beispielsweise das bekannte Transformationssystem auf der Basis von *Agrobakterien* und Ti-Plasmid-Derivaten eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen LOXs erlauben erstmalig das Herstellen neuer γ -Linolensäure-Derivate in großem Maßstab. Hierzu wird γ -Linolensäure als Substrat mit den erfindungsgemäßen LOXs unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Je nach eingesetzter LOX-mutante erfolgt dann eine Hydroperoxylierung der γ -Linolensäure vorzugsweise an Position 6 bzw. Position 9 bzw. Position 6 und 9.

Besonders bevorzugt ist ein γ -Linolensäure-Derivat, das eine Hydroperoxygruppe an Position 6 enthält. Das Derivat kann dann einfach in das Hydroxyderivat überführt werden.

Ein solches γ -Linolensäurederivat war bisher nicht zugänglich, da es an einer LOX mit geeigneter Positionsspezifität fehlte.

Die weiteren Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung.

1. Herstellen der Mutante H597V

Materialien:

Die verwendeten Chemikalien wurden aus den folgenden Quellen bezogen: die Standards für chirale und racemische Hydroxyfettsäuren wurden von Chayman Chem (Ann Arbor, Mi, USA) und Trilinolein (TL) von Sigma, Deisenhofen, (Deutschland) bezogen. Methanol, Hexan, 2-Propanol (allesamt HPLC-Grad) wurden von Baker (Griesheim, Deutschland) bezogen. Restriktionsenzyme wurden von New England BioLabs (Schwalbach, Deutschland) bezogen.

Gerichtete Mutagenese und Proteinexpression:

Für die bakterielle Expression der Wildtyp-LOX und der LOX-Mutante und für die gerichtete Mutagenese wurde das Plasmit pQE-30 (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet, das die cDNA der LOX aus Lipidkörpern von Gurkenkotyledonen als Insert enthielt (LOXpQE 30; vgl. Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M. & Kindl, H. (1998) FEBS Lett. 431, 433-436). Die Mutagenese wurde mit Hilfe des QuikChange-Mutagenese-Kits von Stratagene (Heidelberg, Deutschland), durchgeführt. Oligonukleotide mit den geeigneten Basenaustauschen wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Zur Analyse der Mutationen wurden weitere konservative Basenaustausche eingeführt, um neue Restriktionsspalten zu erzeugen oder bestehende zu deletieren. Weiterhin wurden sämtliche Mutationen sequenziert, und mindestens drei verschiedene Bakterienklone wurden exprimiert und für die Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften eingesetzt. Die Expression von LOX-pQE-30 und sämtlicher Mutanten wurde gemäß Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M. & Kindl, H. (1998) FEBS Lett. 431, 433-436, durchgeführt. Zellen aus 1-Liter-Kulturen wurden in 5 bis 7 ml Lysis-buffer resuspendiert und mit Hilfe einer Ultraschallspitze mit Pulsen für jeweils 30 Sekunden aufgebrochen, und die Zelltrümmer wurden pelletiert. Die Affinitätsaufreinigung der polyHis-verlängerten LOX wurde wie

zuvor beschrieben durchgeführt (vgl. Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M. & Kindl, H. (1998) FEBS Lett. 431, 433-436).

Aktivitätsassay und Probenaufbereitung:

Für die Produktanalyse wurden 0,9 ml der Zell-Lysate mit 0,9 mM LA, 0,9 mM γ -Linolensäure oder 1,2 mM Trilinolein (Endkonzentration) in 100 mM Tris-Puffer pH 7,5 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionen wurden abgestoppt durch den Zusatz von Natriumborhydrid, um die gebildeten Hydroperoxyfettsäuren zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen umzuwandeln. Die Proben wurden auf pH 3 angesäuert, und die Lipide wurden extrahiert (vgl. Bligh, E.G. & Dyer, W. J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917). Die untere Chloroformphase wurde wiedergewonnen und das Lösungsmittel abgedampft. Das verbleibende Lipid wurde mit 0,1 ml Methanol gelöst und Aliquots wurden der HPLC-Analyse unterzogen. Für die alkalische Hydrolyse der Triacylglycerine wurden die Lipidextrakte mit 0,4 ml Methanol verdünnt. Es wurden 80 μ l 40 % (w/v) KOH zugesetzt, und die Proben wurden unter Argonatmosphäre für 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit Eisessig angesäuert, und die Aliquots wurden durch RP-HPLC analysiert.

Analyse:

Die HPLC-Analyse wurde mit einem Hewlett Packard 1100 HPLC System, gekoppelt an einen Diodendetektor, durchgeführt. Die RP-HPLC der freien Fettsäurederivate wurde auf einer Nucleosil C-18 Säule (Macherey-Nagel, 250 x 4 mm, 5 μ m Partikelgröße) mit einem Lösungsmittelsystem aus Methanol/Wasser/Essigsäure (85/15/0.1; v/v/v) und einer Flußrate von 1 ml/min durchgeführt. Die Absorption bei 234 nm (Absorption des konjugierten Diensystems der Hydroxyfettsäuren) und bei 210 nm (Polyenfettsäuren) wurden entsprechend aufgezeichnet. Triacylglycerine, die oxygierte LA enthielten, wurden auf einer Nukleosil C-18 Säule (Macherey-Nagel, Düren,

Deutschland; 250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße) unter Verwendung eines binären Gradientensystems aufgetrennt. Das System umfaßte als Lösungsmittel A: Methanol/Wasser/Essigsäure (90/10/0,1; v/v/v) und als Lösungsmittel B: Methanol/Essigsäure (100/0,1, v/v), und das folgende Gradientenprogramm wurde durchlaufen: 10 min bei 100 % Lösungsmittel A, dann über 20 min mit einer linearen Zunahme an Lösungsmittel B auf 100 % Lösungsmittel B, gefolgt von einem isokratischen Lauf von 50 min bei 100 % B. Die Absorption bei 234 nm wurde aufgezeichnet. Die Direktphasen-HPLC (SP-HPLC) von Hydroxyfettsäurenisomeren wurde auf einer Zorbax SIL Säule (HP, Waldbronn, Deutschland; 250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße) mit einem Lösungsmittelsystem aus n-Hexan/2-Propanol/Essigsäure (100/2/0,1, v/v/v) in einer Flußrate von 1 ml/min durchgeführt. Die Enantiomer-Zusammensetzung der Hydroxyfettsäuren wurde analysiert mit Hilfe von Chiral-Phasen-HPLC auf einer Chiralcel-OD-Säule (Daicel Chem. Industrie, vertrieben von Baker Chem., Deventer, Niederlande; 250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße) mit einem Lösungsmittelsystem aus Hexan/2-Propanol/Essigsäure (100/5/0,1, v/v/v) in einer Flußrate von 1 ml/min. (vgl. Feussner, I., Balkenhohl, T.J., Porzel, A., Kühn, H. & Wastemack, C. (1997) J. Biol. Chem. 272, 21635-21641).

Modellieren der Enzym-/Substratwechselwirkung durch Veränderung der Struktur mit Hilfe gerichteter Mutagenese:

Die durchgeführten Strukturuntersuchungen an zahlreichen Lipoxygenasen verschiedener Quellen und die eigenen Untersuchungen ergaben, daß Position 597, die einen His-Rest in der Lipoxygenase aus dem Lipidkörper der Gurke trägt, ein geeigneter Angriffspunkt sein könnte zum Verändern der Positionsspezifität der 13-LOX. So wurde die Mutante H597V mit Hilfe gerichteter Mutagenese hergestellt. Der Wildtyp und die Mutante wurden überexprimiert als polyHIS-verlängerte Fusionsproteine auf einer Nickelsepharose-Säule gereinigt. Wie erwartet, ergab die HPLC-Analyse des oxygenierten LA-Produkts mit dem Wildtyp-Enzym als Hauptprodukt 13-H(P)ODE (vgl. Figur 4). Für die Mutante H597V wurde jedoch 9-H(P)ODE als Hauptprodukt identifiziert. Es wurde eine weitere Mutante hergestellt, bei der der His-Rest

an Position 597 durch einen weiteren Aminosäurerest ersetzt worden ist, wobei der weitere Aminosäurerest ein größeres Volumen als Valin aber ein kleineres Volumen als Histidin ausfüllt. Es wurde die Mutante H597M hergestellt. Auch diese Mutante zeigte eine starke Bevorzugung der 9-H(P)ODE-Bildung. Die kinetische Charakterisierung der 13-LOX gemäß Wildtyp und der 9-LOX Mutante H597M zeigte, daß die Mutation zu einer stark erhöhten Substrataffinität und einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit führte. Für das Wildtyp-Enzym wurde eine K_m von 114,9 μM und ein LA Umsatz unter V_{max} Bedingung (Substratsättigung) von 12 s^{-1} ermittelt (23 Punkte wurden gemessen zwischen 100 μM und 250 μM LA Konzentration). Im Gegensatz dazu wurde eine V_{max} von 2 s^{-1} und eine K_m von 1.333,3 μM für die H597M Mutante berechnet (21 Punkte wurden zwischen 300 μM und 1.400 μM LA Konzentration gemessen). Diese Daten zeigen, daß die Substratbindung durch die Mutante energetisch behindert sein könnte, so daß mehr Substrat erforderlich ist, um V_{max} zu erreichen. Es wurde eine weitere Mutation untersucht, indem eine Mutante hergestellt wurde, in der das polare Threonin an Position 596 ausgetauscht wurde durch ein Isoleucin, das kleiner ist, aber keine polare Hydroxygruppe enthält. Diese Mutante war katalytisch aktiv (vergleichbar mit dem Wildtyp-Enzym), zeigte jedoch eine zufällig verteilte Positionsspezifität.

Spezifität der Reaktion mit Trilinolein:

Frühere Untersuchungen der Substratspezifität mit LOX aus den Lipidkörpern der Gurke zeigten die Fähigkeit des Enzyms, veresterte Polyaufettsäuren zu oxygenieren (vgl. Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M. & Kindl, H. (1998) FEBS Lett. 431, 433-436; Feussner, I., Balkenhohl, T.J., Porzel, A., Kühn, H. & Wasternack, C. (1997) J. Biol. Chem. 272, 21635-21641). Da Triacylglycerine keine freien Carboxylgruppen enthalten, wurden keine wesentlichen Unterschiede erwartet, wenn das Muster der Oxygenierungsprodukte des Wildtyps mit der 9-LOX Mutante verglichen wird. In der Tat wurde gefunden, daß das Wildtyp-Enzym und die 9-LOX Mutanten eine Trilinoleat-13-LOX-Aktivität zeigten. Jedoch waren die Raten der Trilinolein Oxygenierung durch die 9-LOX Mutanten nur 50 % der Aktivität, wie sie für das Wildtyp-Enzym ge-

messen wurde. Weiterhin führte die Trilinolein-Oxygenierung durch die mutierten Enzyme im wesentlichen zu Triacyglyzerinvarianten, in denen ein LA Rest oxygeniert war. Im Gegensatz dazu wurden mit dem Wildtyp-Enzym alle 3 Linolsäurereste oxygeniert (vgl. Figur 7).

2. Herstellen der LOX-Mutante:

Die für die Herstellung dieser Mutante verwendeten Reagenzien und Verfahren waren im wesentlichen wie bereits oben für die H597V Mutante beschrieben. Im folgenden werden einige Abwandlungen der o. g. Verfahren, die speziell an die Herstellung der V531F Mutante angepaßt waren, erläutert.

Gerichtete Mutagenese und Proteinexpression:

Die Ausgangs-cDNA und der Mutagenesekit waren wie oben beschrieben. Zur Analyse der Mutation wurden weitere konservative Basenaustausche durchgeführt, um eine neue Restriktionsspaltstelle für *BstEII* zu erzeugen. Für die Herstellung der Mutation V531F wurden die folgenden Primer verwendet: GCT TAT GTA ACT GTT AAT GAT TTC GGT TAC CAT CAA CTT ATT AGT CAT TGG TTG CAT AC (kodierender Strang) und GTA TGC AAC CAA TGA CTA ATA AGT TGA TGG TAA CCG AAA TCA TTA ACA GTT ACA TAA (komplementärer Strang). Weiterhin wurde die Mutante sequenziert und 3 verschiedene Bakterienkolonien wurden exprimiert und für die enzymatischen Untersuchungen verwendet. Die Expression von LOXpQE-30 wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Auch die weitere Aufbereitung erfolgte wie bereits oben angegeben. Auch die Analyse des erzeugten Fettsäurederivats (das eine Hydroperoxygruppe in 6 Position enthält), erfolgte wie oben angegeben. Das Ergebnis der SP-HPLC Analyse der Umsetzung von γ -Linolensäure mit V531F ist in Figur 6 gezeigt. Die folgende Tabelle 2 zeigt einen Vergleich der Spezifität des Wildtyps (cslbLOX) mit der Mutante (cslbLOXV₅₃₁F).

Tabelle 2

Vergleich der Produktspezifität von cslbLOX und cslbLOXV₅₃₁F mit γ -Linolensäure

Enzym	(13S, 11E, 9Z, 6Z)- 18:2	(10S, 12Z, 8E, 6Z) -18:2	(9S, 12Z, 10E, 6Z) -18:2	(6S, 12Z, 9Z, 7E)- 18:2
cslbLOX	80 %	17 %	3 %	0 %
cslbLOXV ₅₃₁ F	26 %	14 %	9 %	51 %

i. Figurenbeschreibung

Figur 1 zeigt, daß die Positionsspezifität der LOX-Reaktion von dem Ort der Wasserstoffabspaltung und von der Orientierung des Radikals abhängt. Die [+2]-Radikalanordnung zeigt, daß der Sauerstoff an dem zweiten Kohlenstoffatom in Richtung des Methylterminus des Substrats, gezählt von der Stelle der Wasserstoffentfernung, eingeführt wird. [-2] zeigt die inverse Orientierung der Radikalanordnung.

Figur 2 zeigt die direkte und inverse Substratorientierung an der aktiven Stelle der LOX (abgewandelt von Gardner, H. W. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1001, 274-281).

Figur 3 zeigt ein 3-dimensionales Model der Enzymsubstratwechselwirkung. In der linken Abbildung ist das Wildtyp-Enzym gezeigt. Hier tritt der Methylterminus des Fettsäuresubstrats in Kontakt mit der Seitenkette H608. Der geladene Rest R758 wird durch den Rest H608 abgeschirmt. In der rechten Abbildung wird die Mutante H608V (\equiv H597V) gezeigt. Bei der inversen Orientierung kann die negativ geladene Carboxylgruppe des Substrats eine Salzbrücke mit dem positiv geladenen Stickstoff von R758 ausbilden.

Figur 4 zeigt die HPLC-Analyse von Fettsäuren mit der Mutante H597V. Gleiche Mengen an LOX-Protein wurden mit 0,9 mM LA bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach Reduktion der Lipide mit Natriumborhydrid wurde die Reaktionsmischung auf pH 3 mit Essigsäure angesäuert, und die Lipide wurden extrahiert. Die oxygenierten Fettsäurederivate wurden mittels RP-HPLC isoliert, und die einzelnen Positionsisomere wurden mit Hilfe der SP-HPLC analysiert. Die Verhältnisse von S und R wurden mit Hilfe der CP-HPLC analysiert (eingesetzte Abbildungen).

Figur 5 zeigt die Aminosäuresequenz der Wildtyp-Lipoxygenase aus *Cucumis sativus*.

Figur 6 zeigt die HPLC-Analyse des Hydroxyfettsäuremusters wie es mit der Mutante V531F und γ -Linolensäure erhalten wird.

Figur 7 zeigt die HPLC-Analyse von oxidiertem Trilinolein als Ergebnis der Umsetzung mit dem Wildtyp-Enzym bzw. der Mutante H597V. Gleiche Mengen an LOX-Protein wurden mit einer Emulsion aus 1,2 mM TL für 30 Minuten inkubiert. Die Lipide wurden mit Natriumborhydrid reduziert, und die Reaktionsmischung wurde mit Eisesig auf pH 3 angesäuert. Nach der Extraktion der Lipide erfolgte die Analyse mittels RP-HPLC. Ein repräsentatives Chromatogramm dieser Analyse ist gezeigt. Die Zahlen markieren die erhaltenen LOX-Reaktionsprodukte: 1 bedeutet ein TL-Derivat, enthaltend eine oxygenierte Fettsäure; 2 bedeutet ein doppelt oxygeniertes TL-Isomer, und 3 bedeutet ein 3-fach oxygeniertes TL. Zur Analyse der Positionsisomere der LA Reste wurden die freien Fettsäurederivate mittels alkalischer Hydrolyse und anschließender RP-HPLC erhalten. Die Positionsisomere der Hydroxy-Linolsäure (HODE) wurden als molare Verhältnisse dargestellt, wie sie mittels SP-HPLC ermittelt wurden, wie in den eingefügten Abbildungen gezeigt. Optische Isomere wurden mittels CP-HPLC bestimmt.

Verwendete Abkürzungen sind:

CP-HPLC für chirale Phase HPLC;
RP-HPLC für Umkehrphasen HPLC;
SP-HPLC für Direktphasen HPLC;
HPETE für Hydroperoxyarachidonsäure;
13-H(P)ODE für (13 S, 9 Z, 11 E)-13-Hydro(pero)xy-9,11-Oktadekadiensäure;
9(HP)ODE für (9 S, 10 E, 12 Z)-9-Hydro(pero)xy-10,12-Oktadekadiensäure;
LA für Linolsäure;
LOX für Lipoxygenase;
TL für Trilinolein

Patentansprüche

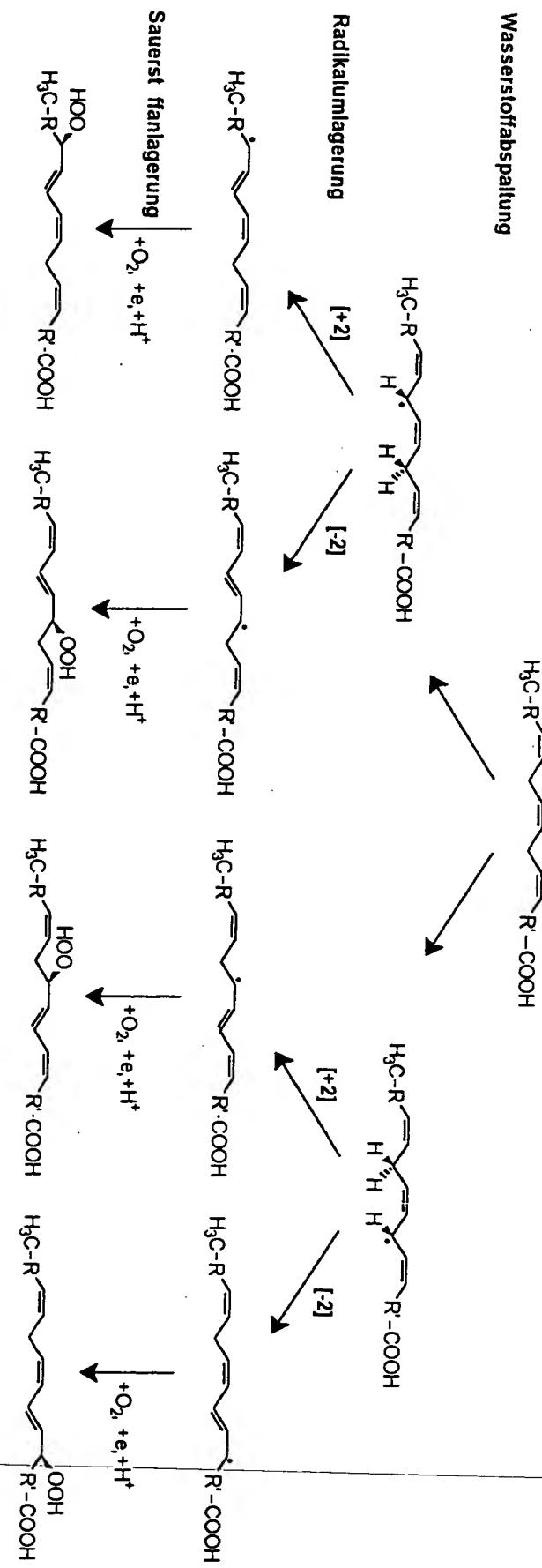
1. Verfahren zum Herstellen einer pflanzlichen Lipoxygenase mit veränderter Positionsspezifität, umfassend den Schritt
 - Austauschen einer oder mehrerer Aminosäuren in einer Wildtyp-Lipoxygenase
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der bzw. die Aminosäureaustausch(e) im Bereich der Aminosäureposition 527 bis 536 und/oder 593 bis 602 der Lipoxygenase aus *Cucumis sativus* oder einer korrespondierenden Position in einer Lipoxygenase aus einer anderen Pflanzenart erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Austausch an Position 531 und/oder 597 der Lipoxygenase aus *Cucumis sativus* oder einer korrespondierenden Position in einer Lipoxygenase aus einer anderen Pflanze erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Austausch an Position 531 zum Vorliegen eines Phe- oder His-Restes und/oder an Position 597 zum Vorliegen eines Val- oder Phe-Restes in der Mutante führt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Austausch an Position 531 ein Val- → Phe- und/oder an Position 597 ein His- → Val-Austausch darstellt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäureaustausch durch gerichtete Mutagenese herbeigeführt wird.
7. Lipoxygenase, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6.

8. Nukleinsäure, die für eine Lipoxygenase nach Anspruch 7 kodiert.
9. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 8.
10. Zelle, enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 8 und/oder einen Vektor nach Anspruch 9.
11. Pflanze oder Pflanzenteil, umfassend eine Wirtszelle nach Anspruch 10.
12. Verfahren zum Herstellen von 6-, 9- und/oder 6, 9-Hydroperoxy- γ -Linolensäure, umfassend den Schritt
 - Umsetzen von γ -Linolensäure mit einer Lipoxygenase nach Anspruch 7.
13. Verwendung einer Lipoxygenase nach Anspruch 7 zum Herstellen von 6-, 9- und/oder 6, 9-Hydroperoxy- γ -Linolensäure.
14. γ -Linolensäurederivat, enthaltend eine Hydroperoxygruppe oder eine Hydroxygruppe an Position 6.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen von pflanzlichen Lipoygenasen mit veränderter Positionsspezifität sowie die durch das Verfahren erhaltene Lipoygenase und deren Verwendung zur Hydroperoxylierung von Substraten. Insbesondere erlauben die erfindungsgemäßen LOXs erstmalig das Herstellen neuer γ -Linolensäure-Derivate in großem Maßstab. Hierzu wird γ -Linolensäure als Substrat mit den erfindungsgemäßen LOXs unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Je nach eingesetzter LOXs-Mutante erfolgt dann eine Hydroperoxylierung der γ -Linolensäure, vorzugsweise an Position 6 bzw. Position 9 bzw Position 6 und 9.

FIG. 1



13-LOX

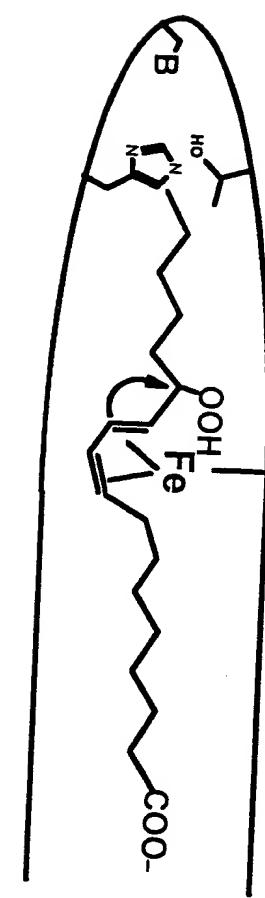


FIG. 2

9-LOX

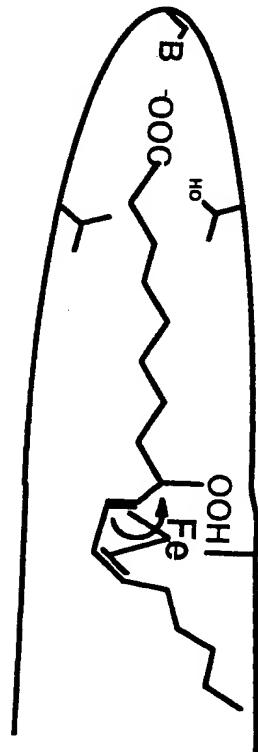


FIG. 3

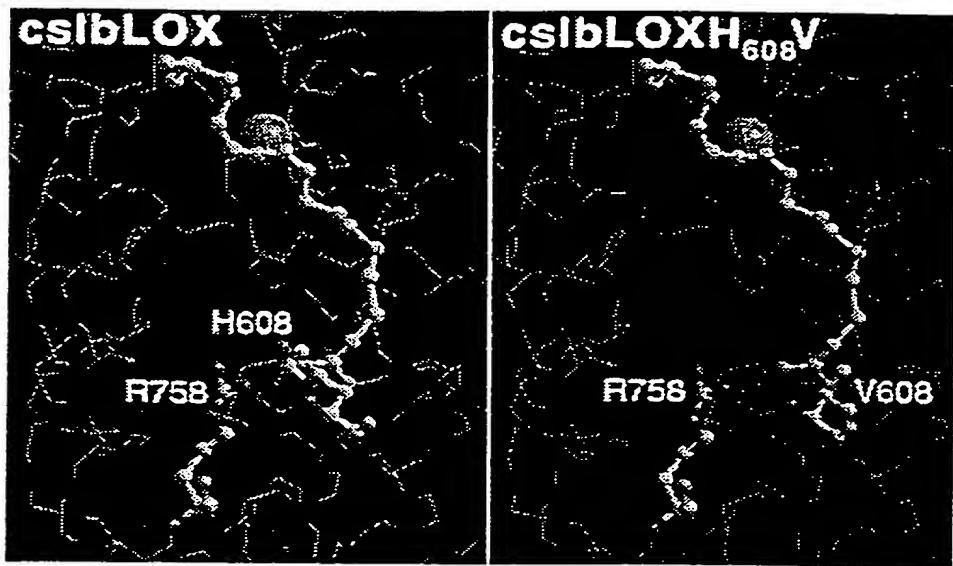


FIG. 4

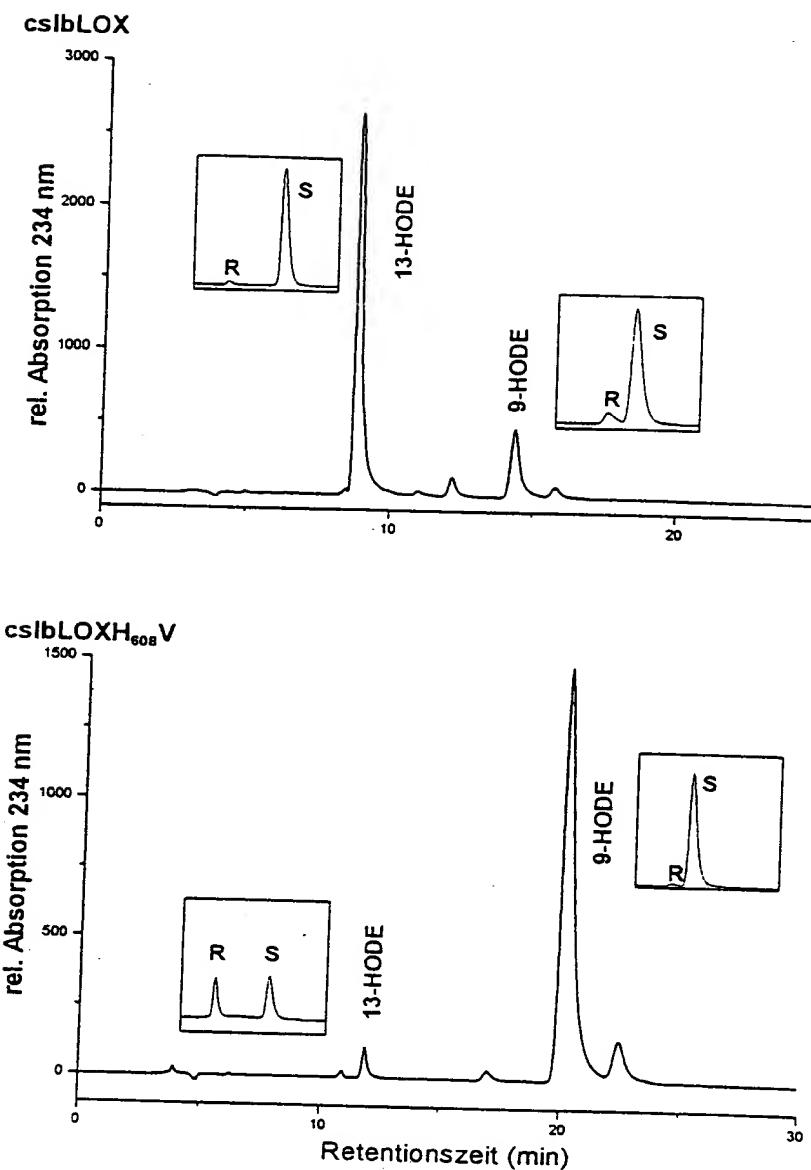


FIG. 5

1 MFGIGKNIIE GALNTTGDLA GSVINAGGNI LDRVSSLGGN KIKGVILMR SNVLDFTEFH
61 SNLLDNFTEL LGGGVSFQLI SATHTSNDNR GKVGNKAYLE RWLTSIPPLF AGESVFQINF
121 QWDENFGFPG AFFIKNGHTS EFLKSLTLD DVPGYGRVHF DCNSWVYPSG RYKKDRIFFA
181 NHVYLPSEQTP NPLRKYREEE LWNLRGDGTG ERKEWDRIYD YDVYNDIADP DVGDHRPILG
241 GTTEYPYPRR GRTGRPRSRR DHNYESRLSP IMSLDIYVPK DENFGHLKMS DFLGYTLKAL
301 SISIKPGLQS IFDVTPNEFD NFKEVDNLFE RGFPIPFNAF KTLTEDLTPP LFKALVRNDG
361 EKFLKFPTPE VVKDNKIGWS TDEEFAREML AGPNPLLIRR LEAPPPTSKL DPNVYGNQNS
421 TITEEHIKHG LDGLTVDEAM KQNRLYIVDF HDALMPYLTR MNATSTKTYA TRTLLLKDD
481 GTLKPLVIEL ALPHPQGDQL GAIKLYFPA ENGVQKSIWQ LAKAYVTVND VGYHOLISHW
541 LHTHAVLEPF VIATHRQLSV LHPIHKLLVP HYKDTMFINA SARQVLINAN GLIETTHYPS
601 KYSMELESSIL YKDWTFPDQA LPNNLMKRLG AVEDESSAPHG LRLLINDYPF AVDGLDIWSA
661 IKTWVQDYCC LYKDDNAVQ NDFELQSWWN ELREKGHADK KHEPWWPKMQ TLSELIESCT
721 TIIWIASALH AAVNFGQYPP GGYILNRPTT SRRFMPEVGT AEYKELESNP EKAFLRTICS
781 ELQALVSI SI IEILSKHASD EVYLGQRASI DWTSDKIALE AFEKFGKNLF EVENRIMERN
841 KEVNLKNRSG PVNLPYTLLV PSSNEGLTGR GIPNSISI

FIG. 6

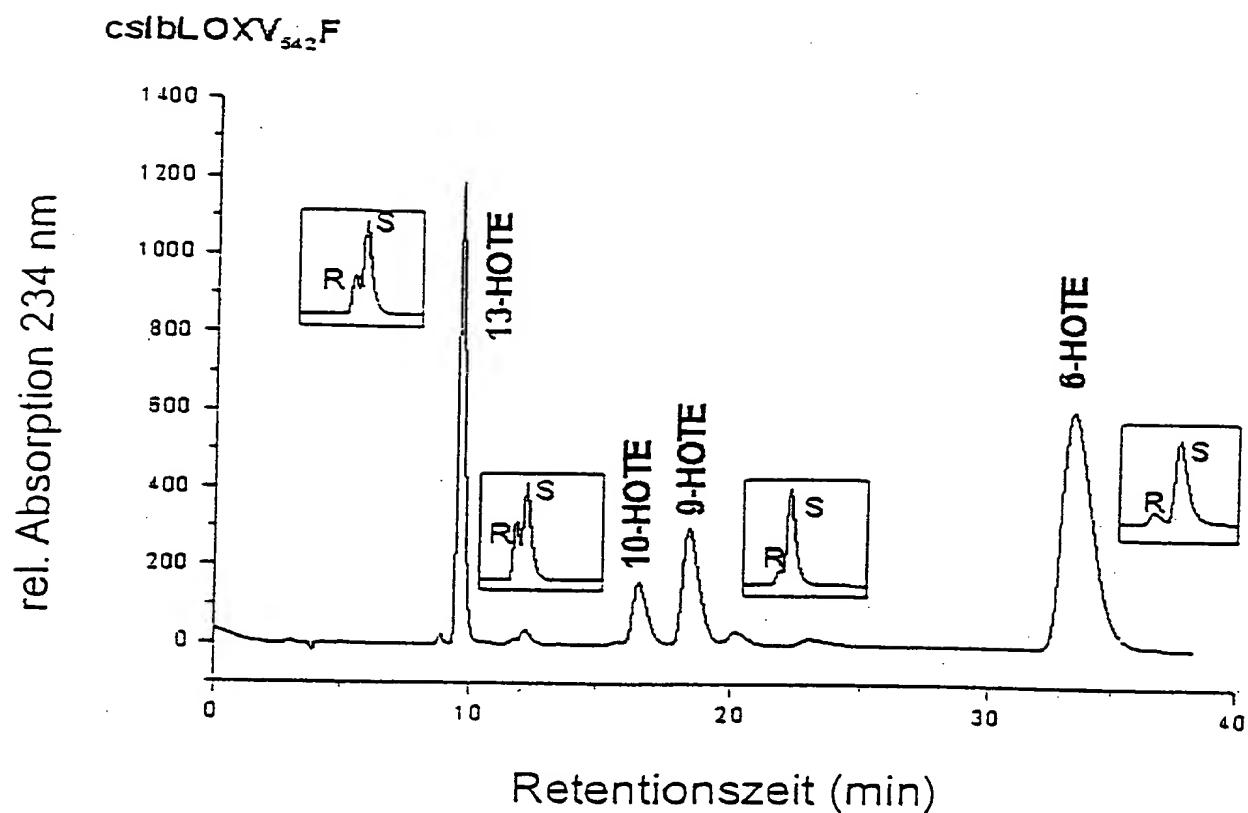
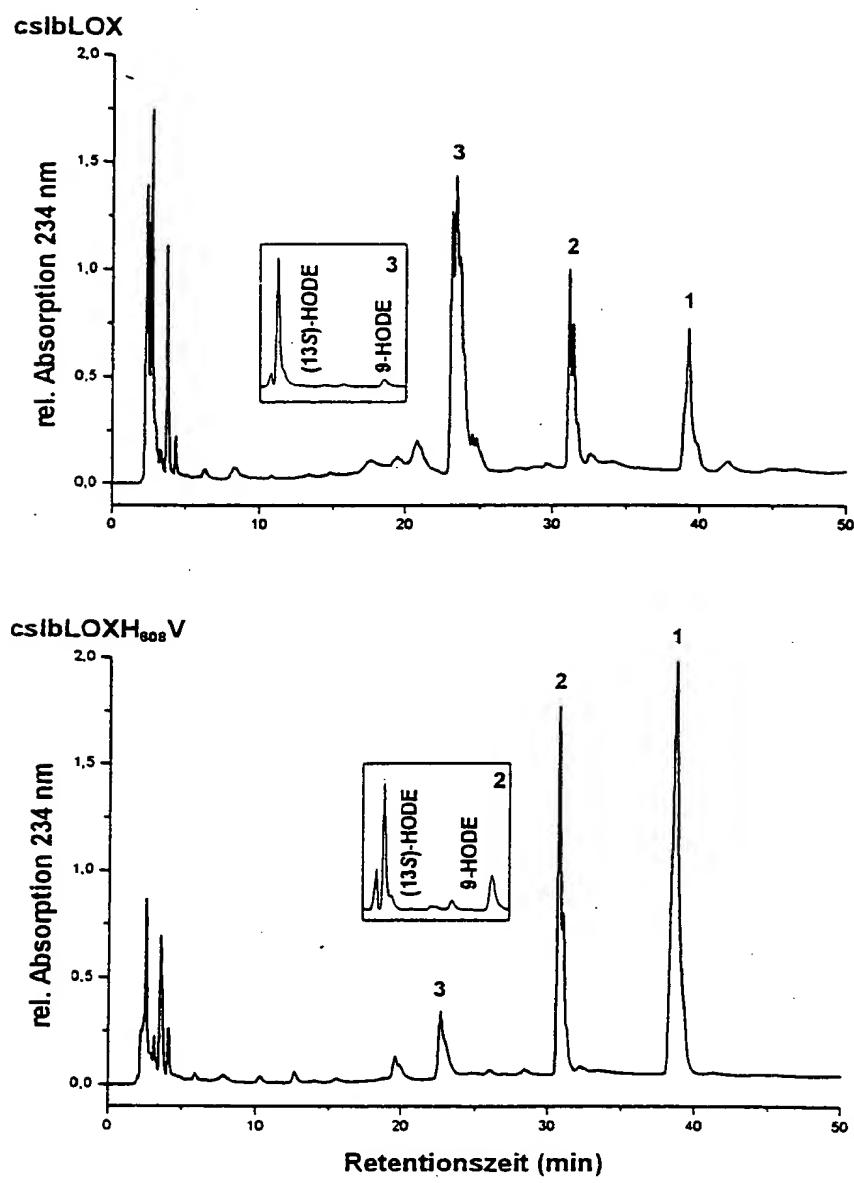


FIG. 7



✓